

Fehérje-szénhidrát kölcsönhatások vizsgálata in vivo kísérletekben

Témafelelős: Baintner Károly; OTKA T 43541

Tartalomjegyzék

Alapfogalmak	2.
Előzmények	2.
Kutatási eredmények	3.
1. A peritoneális szekréció lektines indukálása	3.
1.1. A peritoneális szekréció mérése és az indukálás körülményei	3.
1.2. Általános hatások	3.
1.3. Az indukált ascites folyadék tulajdonságai és sejtszáma	3.
1.4. A hashártya reagálásának gyorsasága	4.
1.5. Hasúri leukocyták átvitele	4.
1.6. A különböző lektinek hatásai	4.
1.7. A mellúri szekréció	6.
1.8. A makromolekulák tesztelése és a polikationok hatása	6.
1.9. A sejtfelszíni keresztkötések szerepe	7.
1.10. A ConA-indukált ascites gátlása	8.
1.11. Az LPS és a hisztamin hatása a ConA-indukált ascitesre	8.
1.12. Egyéb vizsgálatok	10.
2. A hasüregbe vitt lektinek egyéb hatásai	10.
2.1. A szervsúlyok változásai	10.
2.2. A lektinek késői hatása a szubperitoneális erekre és szövetekre	10.
2.3. Az i.p. beadott CINC-1 hatása a leukocytákra	12.
2.4. A ConA-kezelt hashártya TEM vizsgálata	12.
2.5. A jelátvitel	13.
3. Lipopoliszaccharid (LPS) kísérletek	13.
3.1. LPS izolálása különböző Gram-negatív baktériumokból	13.
3.2. Az LPS hatása a bél morfometriai tulajdonságaira	13.
3.3. A ConA-LPS reakció vizsgálata	14.
4. Lektinek tisztítása	14.
Rövid összefoglalás (másolat)	15.
Megjegyzések	15.
Javaslat bírálókra	15.

Alapfogalmak

A **lektinek** szénhidrát-kötő fehérjék, de nem enzimek és nem immunglobulinok. A növényi lektinek felhasználhatók szénhidrát-reagensekként, specificitásuk különböző.

A **lipopoliszaccharid** (endotoxin) a Gram-negatív baktériumok külső membránjának biológiailag aktív anyaga. Alapvetően különböző cukrok polimerjéből áll, a molekula egyik vége azonban acyl-oldalláncokat tartalmaz (lipid A).

A **hashártya** egy alapmembránt befedő **mesothel** sejtekből áll. Szekréciójuk biztosítja, hogy a hasi szervek akadálytalanul elmozdulhassanak egymáson és a hashártya parietális lemezén (pl. bélmozgás, légzés, terhesség/vemhesség során).

Jelentésünkben a hasüri folyadékgyülemet nevezzük **ascitesnek**. A Light-féle kritériumok szerint ez lehet exudátum és transudátum jellegű. Az előbbi esetében a folyadék fehérje tartalma nagyobb, mint a vérszérum fehérje koncentrációjának fele, az utóbbi esetben pedig a felénél kisebb.

Előzmények

A jelen OTKA támogatás előtti kísérleteinkben megvizsgáltuk a növényi lektinek megtapadását a gyomor-bélcsatorna hámnán, továbbá megvizsgáltuk hatásukat az étvágyra, a hasnyálmirigy exocrin szekréciójára és a bélszekrécióra. Tisztáztuk a bélszekréció-stimuláló hatás mechanizmusát.

Egy kontroll kísérlet során parenterálisan is vittünk be lektint, mégpedig a hemagglutináló hatás miatt nem intravénásan, hanem a hasüregbe. Erős peritoneális szekréciót tapasztaltunk. Az irodalom átfésülése során azt láttuk, hogy ezt a jelenséget mások már többször is felfedezték, viszont a létezésén kívül semmit sem volt ismert róla. Ennek vizsgálata vált a jelenlegi kísérletek vezérfonalává, miközben a lektinek vizsgálatáról a hangsúly fokozatosan egy kevésbé ismert, de életfontos folyamat, a peritoneális szekréció vizsgálatára tevődött át.

Kutatási eredmények

1. A peritoneális szekréció lektines indukálása

1.1. A peritoneális szekréció mérése és az indukálás körülményei

Kísérleteinket fiatal patkányokon kezdtük, aminek egyetlen előnye a korábbi perorális kísérletekkel való összehasonlíthatóság volt. Később áttértünk az SPF egerekre (NMRI, néhány kísérletben CD1) és így csökkenteni tudtuk a lektin felhasználást. Az állatkísérletekhez engedélyekkel rendelkezünk.

Az alapkísérlet egyszerű volt: A lektin i.p. beadása után bizonyos idővel levágtuk az állatot, hasát felnyitottuk és az ascites folyadékot gondosan kipipettáztuk. A volument átpipettázással mértük. A kezeletlen kontroll állatokban a hasúri folyadék volumene nem volt mérhető, a kontroll BSA sem indukált ascitest. Az i.p. injekció során bevitt 0,1 ml fiziológiás sóoldat oldószert kb. 20 perc alatt tűnt el és utána helyreállt a korábbi állapot. Az értékek szórásának csökkentése végett a beszúrás körülményeit standardizáltuk, a volument pedig a levágott állat súlyának %-ában fejeztük ki.

Modell lektinként eleinte a kerti bab fitohemagglutinin (PHA) használtuk, később pedig a concanavalin A-t (ConA), ami egy trópusi növény babjának aránylag olcsó lektinjé.

Dózis-hatás görbét és idő görbét vettünk fel. Ennek alapján egereknél a 2,5 órás kísérleti időt választottuk ki (a maximum kezdete). Mivel azonban egyes inhibitorok gyorsan lebomlanak, az ilyen kísérleteket 1 órára rövidítettük. A rutin egér-kísérletekhez a 25 mg/ttkg dózist használtuk, amit egyes esetekben 40 mg/ttkg-ra emeltünk. Az inhibitorokat általában 15 perccel a ConA challenge előtt adtuk be a bőr alá.

1.2. Általános hatások

Az i.p. beadott lektinek hatására az egerek csendesebbé váltak, kevésbé voltak mozgékonyak. Az étvágy gyorsan csökkent (patkány kísérlet) és nagyobb lektin adagok esetén 15 perc alatt teljesen megszűnt. Ez nagyon különbözött a perorális beadás eredményeitől (korábbi kísérletek), ahol csupán kétféle lektin (PHA és RPA) okozott étvágy-csökkenést, azt is csak részlegesen és nagyon nagy adagban (100 mg/ttkg p.o.).

A perorálisan bevitt lektinek nem okoztak ascitest és az intraperitoneálisan beadott lektinek sem indukáltak a bélben folyadék gyülemet, más szóval a kétféle beadás között nem volt „áthallás”.

1.3. Az indukált ascites folyadék tulajdonságai és sejtszáma

A ConA-stimulálás utáni első órákban az ascites-folyadék **könnyen folyó és fehérjedús** volt, szérumban fehérjéket tartalmazott, beleértve az immunglobulint is. Az idő előre haladtával azonban fokozatos változások történtek: Hat óra múltán az ascites-folyadék már **viszkózussá vált**, pipettázáskor könnyen felhabzott, fibrin-szálak jelentek meg benne; fagyasztás és felolvasztás után kocsonyás részek váltak ki. Ennek ellenére a fehérje koncentráció (biuret) nem változott szignifikánsan 2,5 óra és 14 óra között (a vérérszámhoz viszonyítva 58 ± 8 és 55 ± 11 %, $n = 10$). A Light-féle kritérium alapján (>50 %) ez **exudátumot** jelent. Közben a vér besűrűsödni látszott; ezt patkányon próbáltuk mérni, de az eredmények inkonkluzívek maradtak.

Megmértünk néhány szérumban enzimet az ascites folyadékban (Kaposvári Egyetem, Onkoradiológia) és az AST-nél (aszpartát transzamináz) kaptuk a legjobban értékelhető eredményeket. A szekréció előrehaladtával jelentősen nőtt ugyan az enzim aktivitás, de ez nem jelentett koncentráció emelkedést. Ugyanígy más enzimek (LDH, ALT) mérési eredményei sem utaltak arra, hogy szervek károsodtak volna.

A hasüregben levő fehérvérsejtszám mérésekor a kiinduló értéket (ascites híján) csak a hasüreg fizvizes kimosásával tudtuk megállapítani. A ConA beadása után egy órával a **leukociták aggregálódása** miatt az ascites folyadék főként sejtaggregátumokat tartalmazott, amelyek hajlamosak voltak a kitapadásra, és alig volt szabad leukocita. Ezután a fehérvérsejt szám 6 óráig folyamatosan és erősen nőtt, nyilván a bevándorlás miatt. Az ennél később vett mintákból azonban a fibrin miatt már nem lehetett sejtszámolást végezni.

Mivel az automata készülék a humán vérre van beállítva, az egyes fehérvérsejt típusokat Giemsa-festés után, mikroszkóppal próbáltuk elkülöníteni az ascites folyadékban; az átmeneti sejtalakok miatt azonban ez is pontatlannak bizonyult, és így a sejtípusok szempontjából a szövettani vizsgálatokra hagytuk (lásd 1. kép).

1.4. A hashártya reagálásának gyorsasága

Ismeretes, hogy az Evans blue nevű amino-festék a szérum fehérjékre tapad, elsősorban a szérum albuminra. Evans blue-nak egerek farokvénájába való fecskendezésével indikáltuk a szérum albumin kiáramlását a keringésből. Kezeletlen hashártyájú egereknél a festék az i.v. beadás után csak órákkal jelent meg a hasüregben.

Az i.p. beadott ConA esetén problémát jelentett a peritoneális szekréció megindulási idejének a mérése, hiszen az első fázisban még jelen volt az injekcióval bevitt folyadék. Az Evans blue/albumin komplex megjelenése viszont jelezte, hogy a szekréció 10 percen belül megindult. Ezt azért tekintjük **nagyon gyors** hatásnak, mert az erek lumene és a hasüreg között több sejtréteg és kötőszövet is van. Amikor az i.v. befecskendezést a ConA challenge után végeztük, az Evans blue/albumin átjutásának kezdete még inkább lerövidült, kb. 5 percre.

1.5. Hasúri leukocyták átvitele

Ismeretes, hogy a hasüregbe adott ConA egyaránt rátapad a mesothel sejtekre és a hasúri leukocitákra is. Felmerült ezért a kérdés, hogy a ConA közvetlenül hat-e a hashártyára vagy pedig ez a leukocitákból (elsősorban a makrofágokból) felszabaduló citokinek és más ágensek közvetítésével történik meg. Két-két egérből ezért fehérvérsejteket gyűjtöttünk össze (kimosás, centrifugálás, felfuszpendálás) és egy-egy egér hasüregébe fecskendeztük. Egy óra múlva megmértük az ascites folyadék volumenét. A kísérletet megismételtük úgy, hogy a sejteket ConA-val kezeltük, majd a sejteket lecentrifugáltuk és a meg nem kötött lektint a felülúszóval együtt eltávolítottuk. Ez utóbbi esetben enyhe ascites mutatkozott, ami megmagyarázható azzal, hogy a megkötött lektin már nem távolítható el a sejtfelszínről, sőt az a leukocitát a hashártyához tapaszthatja. Ez okból ezek a kísérletek csak tájékoztató jellegűek voltak. A kérdés végleges eldöntése mesothel sejtek tenyésztésének permeabilitás vizsgálatával lehetséges (egy következő OTKA menetben).

A fenti problémák ellenére a leukocita átviteli kísérletek és a peritoneális szekréció gyors reagálása (1.4. fejezet) együttesen **arra utalnak, hogy a lektin közvetlenül a hashártyára (a mesothel sejtekre) hat. Ez azonban csak a kezdeti szekrécióra érvényes.** Néhány órával később ugyanis a szekréció jellege fokozatosan megváltozik (lásd 1.3. fejezet) és egyre több gyulladásos tünet jelentkezik, ahol már citokinek, illetve más ágensek általi mediáció tételezhető fel (lásd 2. fejezet).

1.6. A különböző lektinek hatásai

Az alkalmazott lektinek **lefedték a főbb lektin-csoportokat**, a szénhidrát-felismerés alapján osztályozva. A lassan ható toxikus (RIP) alegységet a lektinek közül egyedül az SNA-I tartalmazta. A kolera toxinnak a nem-toxikus (B) alegységét használtuk, a ricinus-babból származó RCA₁₂₀ pedig nem azonos a toxikus ricinnel.

A kerti bab lektinjének (PHA) L₄ és EL polipeptid-láncokból álló formái, illetve a glycosyl-oldallánc mentes PHA-P egymáshoz hasonló hatásúak voltak.

Rövid.	Latin név	Forrás	Szénhidrát specificitás
ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>	jack bean	glükóz/mannóz, GlcNAc kissé
VFA	<i>Vicia faba</i>	lóbab	glükóz/mannóz
GNA	<i>Galanthus nivalis</i>	hóvirág hagyma	mannóz- α (1,3)mannóz
TPA	<i>Tetragonolobus purpureas</i>	asparagus pea	L-fukóz
DSL	<i>Datura stramonium</i>	maszlag	poli-GlcNAc
WGA	<i>Triticum vulgare</i>	búzacsíra	sziálsav- β (1,6)Gal-GlcNAc
MAA	<i>Maackia amurensis</i>	pillangós fa	sziálsav- α (2,3)Gal/GlcNAc
SNA-I	<i>Sambucus nigra</i>	bodza kéreg	sziálsav- α (2,6)Gal/GlcNAc
PHA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	kerti bab	komplex specificitás*
RPA-I	<i>Robinia pseudoacacia</i>	akácfa kéreg	komplex specificitás*
SBA	<i>Glycine max</i>	szójabab	N-acetil-galaktozamin
AHA	<i>Arachis hypogaea</i>	földi mogyoró	terminális galaktóz
RCA ₁₂₀	<i>Ricinus communis</i>	ricinus bab	galaktóz
B-alegység	<i>Vibrio cholerae</i>	kolera toxin	GM ₁ gangliozid

*) Nagyobb biantennáris szénhidrát-rész felismerése.

Korábbi vizsgálatainkból kiderült, hogy a bélben csak azok a lektinek váltanak ki szekréciót, amelyek képesek megtapadni a bélhámsejteken. Ugyanezt tapasztaltuk az intraperitoneálisan beadott lektinek esetében is: a GNA, TPA és AHA nem indukált ascitist. Egy tájékoztató kísérletben a kolera toxin B alegysége is hatástalan volt.

A mesothel sejtek felszínén előforduló glikozil-oldalláncok többfélék és sokféle membrán-fehérjéhez kapcsolódnak, ezért a lektinek megtapadása alapján nem lehetett a glikoproteineket azonosítani. A kolera toxin B-alegység alkalmas lett volna ugyan a GM₁ gangliozid (glikolipid) azonosítására, de épp ez a lektin hatástalan maradt. A modell-lektinként használt **ConA mannóz-** és glükóz-maradékokat ismer fel a komplex szénhidrátokban, de a glükóz az emlősök glikoproteinjeiben nem fordul elő. Gyengébb affinitással ismeri fel az N-acetil-glükozamint, valamint a szénhidrát-kötő rész közelébe kerülő hidrofób részeket.

A különböző lektineknek a hashártyán való megkötődési képességét mások már vizsgálták. **A megkötődő lektinek hatásai minőségileg azonosak voltak ugyan, de a szekréció stimulálásának mértéke jelentős különbségeket mutatott.** Patkánynál és egérnél is a búzacsíra agglutinin (WGA) volt a legerősebb ascites-indukáló hatású lektin. Ugyancsak erős hatással bírt a kerti bab lektinje (PHA), továbbá az RPA-I és a ConA. Gyengébben hatott a szója lektin (SBA), a lóbab lektinje (VFA), az SNA-I, az MAA, az RCA₁₂₀ és a DSL. Magas áruk miatt azonban az utóbbi két lektint csak két, ill. egy egéren tudtuk kipróbálni, ezért az eredmény csupán tájékoztató jellegű.

A fentebb felsorolt növényi lektinek a szervezetben levő sejtfelszíni szénhidrátokkal reagáltak. Előfordul azonban a fordított helyzet is: a szervezet saját lektinjei, amelyek főként a veleszületett immunitással kapcsolatosak, mintegy várják a kívülről bekerülő (gyakran a kórokozó csírák felszínén levő) szénhidrátokat, megkötik őket és riadóztatják az immun-rendszert. Ilyen például a szérumban és testnedvekben levő mannóz-kötő fehérje (MBP), amely aktiválódásakor a komplement kaskádát indítja be. Mivel a növényi fehérjék, köztük a lektinek is gyakran tartalmaznak mannóz-dús glikozil-oldalláncot, ezért felmerült a kérdés,

hogy esetleg ezen keresztül érvényesül a lektinek ascites-indukáló hatása. A kísérletek azonban cáfolták ezt, hiszen a glikozil-oldallánc nélküli lektinek között nagyon erős ascites-indukálók vannak (WGA, ConA, PHA-P), de számos glikozilált lektin is hatásos volt (PHA-EL, RPA-I, MAA, SBA, SNA-I, DSL, RCA₁₂₀). A hatástalan lektineket szintén fel lehetett osztani glikoziláltra (TPA) és oldallánc nélküliekre (GNA and AHA). Ezért azt a következtetést vonjuk le, hogy **a lektinek ascites-indukáló hatását nem az MBP mediálja.**

1.7. A mellúri szekréció

Amikor kerti bab lektint (PHA-EL, 20 mg/ttkg) adtunk be i.p. patkányoknak, a folyadék-gyülem először a hasüregben jelent meg, majd néhány óra késéssel a mellüregben és a szívburokban is, tehát az összes savós üregben. A beadás utáni 16. órára a hasúri folyadék volumene már erősen csökkenőben volt és számértékben találkozott a növekvő mellúri folyadék volumenével. A PHA tehát **szövet-specifikus hatást gyakorolt a savós hártyákra**, más szóval ott is hatott, ahova nem juttattunk lektint. Ez közvetve arra is utal, hogy **a lektin nem növeli meg az erek endotheljének permeabilitását**, hiszen egy általános ödéma kialakulása esetén aligha gyűlhetne össze nagyobb mennyiségű folyadék a mellüregben. Az irodalom átfésülése során találtunk ugyan a lektineknek az endothelen való megkötésére vonatkozó adatokat, de ezek egyike sem számolt be az ér-permeabilitás növekedéséről.

Megvizsgáltuk ezután, hogy a hashártyáról a mellhártyára átjutó hatás mennyire általánosítható a lektineknél. Ismeretes, hogy a szérum fehérjék (a szérum albumin kivételével) glikoziláltak, ezért a legtöbb lektinnel reagálni képesek, továbbá, hogy az így megkötött lektinek áthelyeződhetnek a sejtfelszíni glikozil-oldalláncokra. Vizsgálatainkban kimutattuk, hogy **i.p. beadás után azok a lektinek képesek pleurális szekréciót stimulálni, amelyek a szérum fehérjékkel nem-precipitáló komplexet képeznek** (PHA, RPA-I és SBA), ezzel szemben (az agaróz gélben) a szérum fehérjéket precipitálni képes lektinek hatása nem jut át a mellüregbe (ConA, VFA, WGA). A vörösvértestek agglutinálására mindkét lektin-csoport képes, de ezt a szérum fehérjék némileg gátolják. Egy harmadik lektin-csoport sem a hasüregben, sem a mellüregben nem hatott (GNA, TPA), hasonlóan a kontroll BSA-hoz.

Az i.p. beadott lektinek fokozatosan felszívódnak a hasüregből (lásd 2.2. fejezet). Úgy tűnik ezért, hogy **a precipitáló lektinek erősebben visszatartódnak** a keringésben vagy erősebben kiszűri őket a lép és a máj, míg a nem-precipitáló lektinek könnyebben eljutnak a mellüregbe, ahol a szérum fehérjékről a sejtfelszínre transzponálódnak. Ezt a feltételezést támasztja alá az a kísérlet, amikor nagy adag (100 mg/ttkg) PHA-nak a hasüregbe vitele után egy nappal ki lehetett mutatni a lektint a mellúri folyadékból a vörösvértest agglutináló hatás alapján, még ha gyengén is. Mindamellett nem lehet kizárni azt a lehetőséget sem, hogy a hashártyából a lektin hatására valamilyen faktor szabadul fel és jut át a mellhártyára. Ilyen mediátor átjutást tételezünk fel a hashártya és a szubperitoneális erek között, továbbá az étvágytalanság kialakulásánál. A rekeszen történő közvetlen átjutás azonban teljesen valószínűtlen.

1.8. A makromolekulák tesztelése és a polikationok hatása

A lektinek ascites-indukáló hatásának vizsgálata után felmerült a kérdés, hogy milyen más vegyületek képesek hasonló hatást kiváltani. Mivel a kis molekulák könnyen és gyorsan felszívódnak a hasüregből, ezért az esetleges stimulálás rövid ideig tartana és nem gyűlne össze a kimutatáshoz elegendő hasúri folyadék. Ezért a rendelkezésünkre álló **makromolekulákat teszteltük**, majd egy későbbi fázisban azokra a makromolekulákra koncentráltunk, amelyek reakcióba lépnek a sejtfelszínnel, mégpedig gyenge kölcsönhatások révén. Kihagytuk az olyan agresszív szereket, amelyek kovalens kötéseket képeznek, elsősorban a fehérjékkel. Ezek általában amúgy is kis molekulák.

Negatív eredménnyel próbáltunk ki számos fehérjét (BSA, ovalbumin, szója tripszin inhibitor), glikoproteint (sertés gyomor mucin, bovin állalatti nyálmirigy albuminoid) és más természetes- (élesztő RNS, dextrán) és mesterséges makromolekulát (PVP-25, PEG-400). A hasüregben végzett antigén/ellenanyag reakció sem eredményezett ascitest.

Kipróbáltunk két olyan szénhidrátot is, amelyekről ismeretes volt a gyulladás- és ascites-keltő hatás. A λ -carrageenan egy tengeri moszat gél-képző szénhidrátja, a zymosan pedig az élesztő sejtfalanyaga, amit a makrofágok fagocitálnak. Ez a két anyag a mi kísérleteinkben is indukált ascitest, de (azonos dózisban és időtartamban vizsgálva) hatásuk jelentősen elmaradt a ConA hatásától. Gyulladás-keltő hatásukhoz viszont hosszabb idő, több óra szükséges.

A lektinek mellett a legerősebb ascites-képzőknek a **polikationokat** találtuk, mégpedig a kationos poliaminosavak formájában. Semleges pH-ra hozás után a szintetikus polilizin és poliarginin azonos dózisban ugyanolyan hatásos volt, mint a ConA, viszont hajlamosak voltak a hasüreg körüli erek kitágítására. A kationos poliaminosavak **D- és L-**módosulatai egyformán hatottak. Gyengébben működött a protamin, ami egy kisebb mólsúlyú kationos fehérje és hatástalan volt a lizozim, egy enyhén kationos túlsúlyú fehérje. (A polihisztidint oldhatósági problémák miatt nem tudtuk vizsgálni.) Szintén hatástalan volt a poliaszparagin, ami töltés nélküli amid-nitrogént tartalmaz, továbbá a polianionos nátrium poliglutamát is. Sőt ez utóbbi vegyület még gátolta is a polilizinnel indukált ascitest, ugyanis együttesen kicsapódtak. Ugyanakkor a poliglutamát egyáltalán nem gátolta a lektines (ConA) ascites indukálást. Mindebből azt a következtetést vontuk le, hogy **a kationos poliaminosavak hatása a pozitív töltések sorozatától függ.**

1.9. A sejtfelszíni keresztkötések szerepe

A ConA négy alegységből álló molekula, ami ennek megfelelően maximálisan négy szénhidrát molekulát képes megkötni, illetve összekötni. Kereskedelmi forgalomban van a ConA szukcinilált változata is, ami két alegységből áll és ezért keresztkötési képessége a lehető legkisebb. Ennek megfelelően a ConA-éhoz képest az azonos dózisú szukcinil-ConA ascites-képzése egy nagyságrenddel kisebb volt. Létezik ugyan monovalens lektin is (hevein), de ez nincs kereskedelmi forgalomban és nem kötődik meg az állati sejteken (W. Peumans, személyes közlés). A fenti kísérletből azt a következtetést vontuk le, hogy **a sejtfelszíni glikoproteinek keresztkötése valamilyen módon szekréciós jelet ad a sejt belseje felé.** A jel kialakulásában szerepet játszhat, hogy a lektin korlátozza a glikoproteinek mozgását a sejtmembrán síkjában.

Felmerül a kérdés, hogy **mi a közös** a kémiaiag nagyon különböző molekula-típusok ascites-képző mechanizmusában. A sejtfelszíni glikoproteinekről faágszerű, merev glikozil-oldalláncok nyúlnak kifelé. Kialakításukban 6-8-féle cukor és még több kovalens kötés-típus vesz részt, és az ágakat többnyire a negatív töltésű szíálsav zárja le. A különböző specificitású lektinek más-más részeket ismernek fel a komplex szénhidrátban, összekötve részben az iker-ágakat is, de a különböző glikoproteinekről eredő ágakat is. A polikationok ugyanakkor nem magát a szénhidrátot, hanem az ágvégeken levő **szíálsav negatív töltéseit** ismerik fel és így kötik össze a glikoproteineket. Nehezebb magyarázni a carrageenan és a zymosan hatását, ahol szénhidrát-szénhidrát kölcsönhatásokat tételezünk fel, amelyek azonban gyengébbnek látszanak a lektines és az ionos kölcsönhatásoknál. Egy előkísérletben megvizsgáltuk a cellulózból álló szűrőpapír hatását is, de ehhez másféle vizsgálati módszerek kidolgozására lesz szükség egy következő kutatási fordulóban.

A fentiekből azt a következtetést vontuk le, hogy az általunk kipróbált **ascites-képző makromolekulák közös tulajdonságának látszik a sejtfelszíni (nem-kovalens) keresztkötések kialakítása.**

1.10. A ConA-indukált ascites gátlása

A ConA-indukált ascites hatásmechanizmusáról úgy próbáltunk információt nyerni, hogy különböző inhibitorok segítségével mintegy „körüljártuk” a jelenséget.

Az OTKA támogatást megelőzően a lektines **bélszekréciót** atropin metilnitrát (muszkarinos acetilkolin-receptor gátló) és hexamethonium klorid (ganglion bénító) kombinációjával csaknem teljesen sikerült gátolnunk. Ugyanezt a kombinációt kipróbáltuk az ascites lektines indukálásánál is, de itt nem gátolt szignifikánsan. Sőt a szekréció Nembutal narkózis esetén is folytatódott (ez utóbbi vizsgálat nem volt kvantitatív). A kísérletekből azt a következtetést vontuk le, hogy **a lektin-indukált peritoneális szekréció nem idegi mediációjú**, és hogy **a lektin-indukált bél- és peritoneális szekréció hatásmechanizmusa alapvetően különbözik egymástól**.

Már a kutatások elején felmerült az a lehetőség, hogy a lektin a hasúri fehérvérsejtek közvetítésével stimulálja a peritoneális szekréciót. Ezért többféle (szteroid és egyéb) **gyulladásgátlót** is kipróbáltunk gátlóként. Ilyen volt az ibuprofen (COX-gátló), a dexamethasone (glükokortikoid) és a thalidomide (NF- κ B inhibitor), de **hatástalanoknak bizonyultak**. A dexamethasone esetén az előkezelések különböző időtartamúak voltak. Annak ellenére, hogy beteg állaton és embernél a peritonitis együttjár az ascites-szel, azt tapasztaltuk, hogy **a lektin-indukált ascites nem jár együtt a gyulladás klasszikus jeleivel, legalábbis az ascites kialakulásának első óráiban**. A későbbi folyamatokat más módszerekkel vizsgáltuk (2.2. fejezet).

Ismeretes, hogy az erek permeabilitásának szabályozásában fontos szerepet játszik a kallikrein aktiválódását követő bradykinin (nonapeptid) felszabadulás. A kallikrein-gátló fehérjével, az **aprotininnel** (100 mg/ttkg s.c., ill. i.p.) 50-60 %-ra lehetett csökkenteni a ConA-indukált ascitest. A szójabab eredetű tripszin inhibitorok (Kunitz, illetve Bowman-Birk típusú inhibitor, az utóbbi a kimotripsint is gátolja), amelyek a kallikreinre nem hatnak, a szekréciót csak kismértékben gátolták.

Ismeretes, hogy a bradykinin az erek endothel sejtjeiben az eNOS-t aktiválja és a keletkező nitrogén-oxid (NO) növeli meg a permeabilitást. Az aprotinines kísérletek folytatásaként a fentihez hasonló mechanizmust kerestünk a peritoneális szekréciónál. Amikor azonban a NO keletkezését **L-NAME**-val (nitro-L-arginin metil-észter) gátoltuk, a szekréció nem változott, a bradykinin lebontásnak **captopril**lel való gátlása pedig nem növelte a szekréciót. Az eredmények magyarázatára kétféle lehetőség van: 1) Az aprotinin valamilyen eddig ismeretlen mediátort is gátol. 2) A bradykinin az irodalomban leírtól eltérő módon is képes hatni.

Ismeretes, hogy a VEGF (vascular endothelial growth factor) nevű citokin egyaránt hat az angiogenezisre és az ér permeabilitásra is a VEGF-R2 receptoron keresztül. Később kimutatták, hogy a VEGF előfordul a hashártyában, egyes petefészek tumorok VEGF-termelése pedig ascitest idéz elő. Megvizsgáltuk ezért, hogy a VEGF részt vesz-e a lektin-indukált ascites kialakításában. A BME Szerves Kémia Tanszékén (Fetter és Berta) szintetizáltak számunkra egy nemrég leírt **VEGF-R2 antagonistát** (ZM323881, quinazolin-származék), ez azonban nem gátolta a szekréciót.

Megvizsgáltuk az **izoproterenol** (β -adrenerg agonista) hatását is. Ez a cAMP koncentrációját növeli meg a sejtekben. A lektin-indukált peritoneális szekréciót szignifikánsan gátolta ugyan, de csak gyengén. A dózist állatvédelmi okok miatt nem emeltük.

1.11. Az LPS és a hisztamin hatása a ConA-indukált ascitesre

A hisztamin felszabadulás a gyulladásos és allergiás folyamatok egyik fontos tényezőjét képezi. Ascitest sem i.p. bevitt hisztaminnal, sem a hasúri hízósejtek degranulációjának előidézésével (compound 48/80) nem tudtunk előidézni. Ellenkezőleg: a

hisztamin kifejezetten gátolta a lektin-indukált ascitest, maximálisan kb. 50 %-os gátlást lehetett elérni.

A lipopoliszaccharid (LPS) megjelenésére élénken reagálnak a magasabbrendű élőlények, mégpedig különböző citokinek felszabadításával. A kontrollként i.p. beadott LPS nem váltott ki ascitest a 2,5 órás kísérleti perióduson belül. Kísérleteinkben az LPS (*E. coli* O83-ból izolálva) már kis adagokban is (0,02 mg/ttkg) kifejezetten gátolta a lektin-indukált szekréciót, maximálisan a harmadára/negyedére csökkentve azt. Nagy LPS-dózisokat is ki lehetett próbálni (10 mg/ttkg), mert a toxikus hatás kifejlődéséhez hosszabb időre van szükség mint a kísérlethez. A s.c., i.p. és i.v. beadás egyaránt hatásos volt.

Az LPS gyorsan kifejtette gátló hatását. Már akkor jelentős gátló hatást észleltünk, amikor egyszerre adtuk be a hasüregbe az LPS-t és a lektint. Ez azonban nem jelent pillanatszerű gátlást, hiszen az állatokat 2,5 órával később vágtuk le és a gátlás eközben is kifejlődhetett. Az egyidejű beadás a hasüreg két különböző pontjára történt, de így sem lehetett elkerülni a ConA és az *E. coli* O83 LPS közötti közvetlen reakciót. Annak ellenére, hogy a ConA nagy feleslegben volt az LPS-hez képest, mégsem nyomta el a gátló hatást. Ennek az lehet a magyarázata, hogy az LPS biológiailag aktív része a lipid A, míg a ConA-val az O-antigén (oligosaccharid) reagál (lásd 2.3 fejezet), másrészt a precipitáció a hasüregben kevésbé tud végbemenni, mint *in vitro*.

Az LPS nemcsak hogy gyorsan hat, de a lektin-challenge előtti előkezelés nagyon hosszú ideig kifejtette a hatását. A stimulált szekréció gátlása csak napok múltán kezdett oldódni és még egy hét után sem tért vissza a teljes reaktivitás.

Ismeretes, hogy a lipopoliszaccharidok elsősorban a TLR4 (toll-like) receptoron keresztül váltják ki különböző citokinek termelését az immun sejtekben; a *Porphyromonas gingivalis* LPS a TLR2 receptoron keresztül hat, a *Rhodobacter spheroides* LPS pedig nem kötődik meg és ezért nem is toxikus. Hogy megállapíthassuk a toll-like receptoroknak az LPS ascites-gátló hatásában való szerepét, beszereztük a két utóbbi baktérium törzset, megállapítottuk tenyészigényeiket (Kocsis Béla) és elkezdtük szaporításukat, hogy elegendő mennyiség legyen az LPS izolálásához. Technikai okok miatt ez a munka későn kezdődött el és jelenleg is még folyamatban van.

Ismeretes, hogy az LPS által felszabadított citokinek és a hisztamin is megnöveli az erek permeabilitását, ezért eredetileg azt vártuk, hogy ezek az ágensek a hashártyára is hasonlóan fognak hatni, más szóval, hogy fokozott szekréciót fogunk tapasztalni. A fenti kísérletek azonban ennek az ellenkezőjét, a részleges (és dózis-függő) gátlást mutatták. Ennek a gátlásnak a hashártyára kellett irányulnia, hiszen a másik barrierre, az endothelre ezek az ágensek nem gátlóan hatnak. Más megfogalmazásban **az LPS és a hisztamin fordított, reciprok módon hat az endothel és a mesothel sejtekre: amíg az elsónél nő a permeabilitás, addig a másodiknál ez részleges gátlás alá kerül.** Bár fenti két sejtípus sok tekintetben hasonlít egymáshoz, eddig is ismert volt, hogy számos különbség is van köztük. Fenti vizsgálataink egy további lényeges különbséget mutattak ki. Négy-éves munkánk számos eredménye közül ezt tartjuk a legjelentősebbnek és a legmeglepőbbnek is.

Az érpermeabilitás növekedésekor ellenanyagok és más antimikrobiális ágensek jutnak ki a keringésből az intersticiumba. Egy általános érpermeabilitás növekedéssel járó hemokoncentráció funkcionális zavarokat okozhat a különböző szervekben, amit tovább súlyosbíthatnak a testnedveknek a savós üregekbe való átáramlása. Ez utóbbi megakadályozásában látjuk a fenti reciprok hatás **fiziológiás jelentőségét.** Az 1.7. fejezetben leírtak szintén az endothel és mesothel eltérő reakciójára utalnak.

A kísérletek során többféle ágenssel is sikerült a lektin-indukált ascitest gátolni, teljes gátlást azonban egyik inhibitorral sem sikerült elérnünk. Ez felveti azt a (nem bizonyított) lehetőséget, hogy a lektin párhuzamosan többféleképp is stimulálja a peritoneális szekréciót

és az inhibitorok ezek közül csak az egyiket gátolják. Megpróbáltuk ezért a megismert **inhibitorok hatását kombinálásukkal** növelni, de ez eddig még nem sikerült.

1.12. Egyéb vizsgálatok

Néhány más anyagot is teszteltünk a ConA-indukált ascites gátlása tekintetében, de hatástalan volt a Cromolyn (antihisztaminikum), a dopamin és a hidroxidopamin. Ugyancsak hatástalan volt az olyan immun-reakció, amikor az ellenanyag nem a hashártya ellen irányult. Ezt úgy hajtottuk végre, hogy nyúlban termelt polivalens anti-bovin szérum ellenanyagot bovin szérummal hoztunk össze a hasüregben.

Megpróbáltuk a ConA- és a PHA-indukált ascites keletkezését azonos lektinnel való **előkezeléssel** (1 nappal korábban) befolyásolni. Az előkezelés nem alakított ki toleranciát, változásként viszont azt lehetett megfigyelni, hogy a keletkező ascites folyadék erősen viszkózus volt, tehát a késői fázisnak felelt meg.

Mások már kidolgozták az **lektino-elektroforézis** módszerét az immuno-elektroforézis mintájára. Ezt a Pécsi Tudományegyetem ÁOK Központi Laboratóriumában próbálták ki számunkra (Schneider Imréné). A ConA-készítmények molekula-méret heterogenitása és talán más okok miatt is azonban ez a módszer csak elmosódott precipitációs íveket adott, amelyek nem voltak alkalmasak a reagáló szérum-fehérjék azonosítására.

2. A hasüregbe vitt lektinek egyéb hatásai

2.1. A szervsúlyok változásai

Megmértük a patkányok belső szerveinek nedves súlyát közepes dózisú (40 mg/ttkg) ConA i.p. beadása után. Ez a kísérlet jóval hosszabb volt, mint az ascites-stimulálási kísérletek. A ConA-kezelt állatok **lépének és májának** súlya a 6. és a 10. órában enyhén, de szignifikánsan ($p < 0,05$) nagyobbak találtuk, mint a BSA-kezelt kontrollokét. Ismeretes, hogy ezek azok a szervek, amelyek eltávolítják a keringésből a fehérje precipitátumokat és a vörösvértest aggregátumokat. A szervsúly változások arra utalnak, hogy a ConA-nak legalábbis egy része fokozatosan felszívódott a hasüregből, és hogy a vérben keletkező kóros termékeket a lép és a máj fokozatosan kiszűrte. A **vese** súlya eközben változatlan maradt.

Kisszámú állaton végzett kísérleteink szerint a kerti bab lektin (PHA) hasonlóan hat a lép és máj súlyára, mint a ConA.

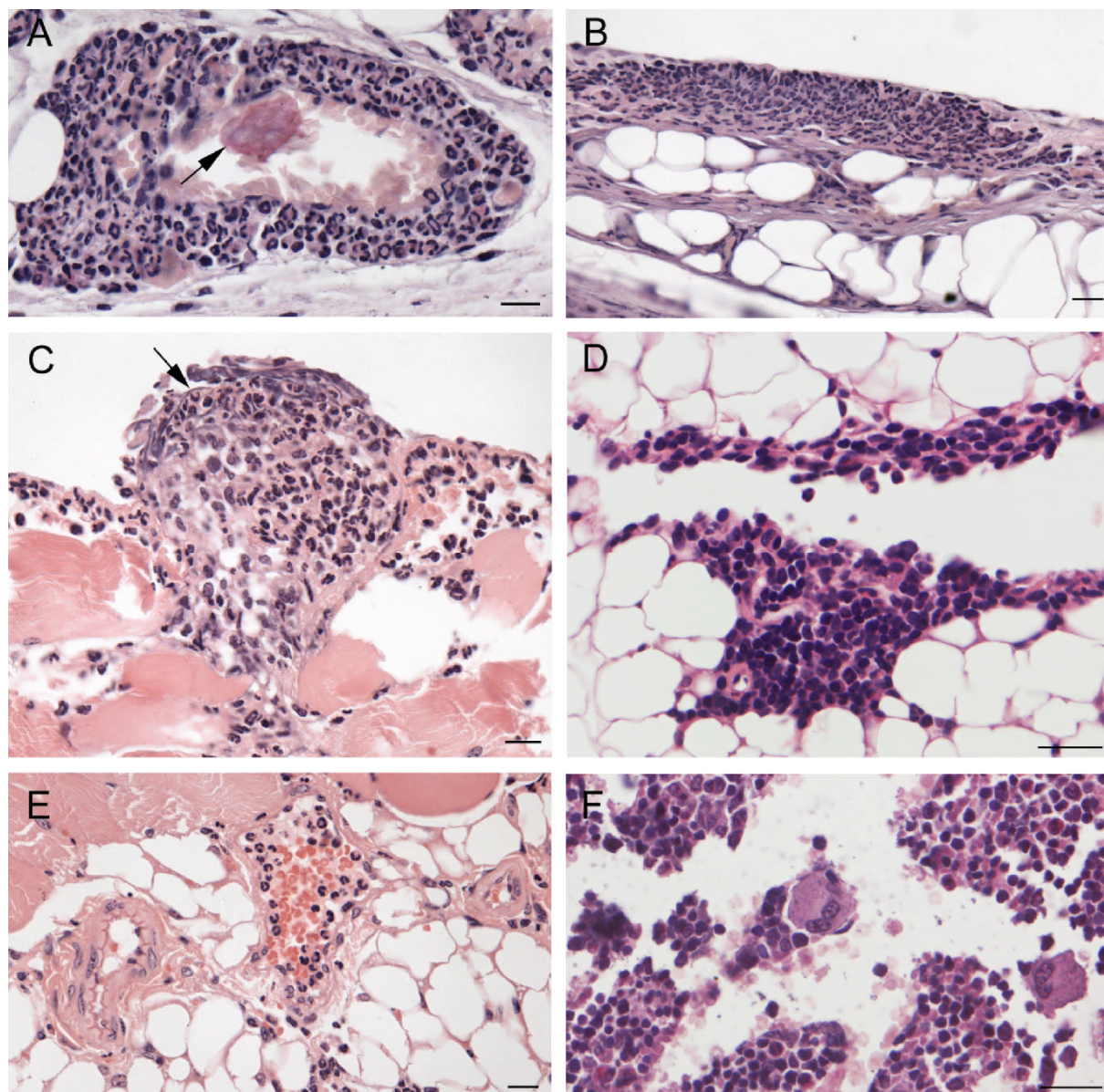
Szövettani vizsgálatokat az említett szerveken nem végeztünk, mert a változások mérsékelt volta miatt nem remélhettük, hogy ezek szövettanilag is biztosan kimutathatóak lehessenek.

2.2. A lektinek késői hatása a szubperitoneális erekre és szövetekre

A hagyományos szövettani technikát a kaposvári Kaposi Mór Megyei Kórház Kórbonctani Osztályának laboratóriumában végezték.

ConA, PHA, SBA, illetve WGA lektineket adtunk be egereknek i.p., az állatokat különböző időközökben levágtuk és szövettani vizsgálatot végeztünk. A legkifejezettebb hatást a búza-csíra lektin esetén (WGA, 10 mg/ttkg) figyelhettük meg, mégpedig 6 órával a beadás után.

A legfeltűnőbb elváltozás az volt, hogy megnőtt a szövetekben a neutrophil granulocyták száma. Ez összefüggésben lehetett azzal, hogy az ascites-folyadékban is folyamatosan nőtt a leukocyták szám az idő előrehaladtával (1.3. fejezet). A granulocyták előfordulása változatos képet mutatott. Egyes helyeken jól meg lehetett figyelni kitapadásukat az erek endothel sejtjeire (PHA kísérlet, 1E kép), másutt a szubperitoneális kötőszövetben (1B kép) fordultak elő. Egészen egyedülálló látványt mutatott azonban **az arteriolák falában való rendkívül erős felhalmozódásuk** (1A kép). Ezt a jelenséget az erős stimulálás mellett azzal



1. kép. Az *i.p.* lektinnel kezelt egerek szövettani vizsgálata. HE festés. Vonal: 20 μ m. Foto: Lukács Ákos.

(A) Neutrophil granulocyták tömege egy arteriola izomrétegében; az intersticiium leukocyta-mentes. Az ér lumenében egy vörösvértest aggregátum látszik (nyíl). Hat órával 10 mg/ttkg WGA *i.p.* injiciálása után.

(B) A hashártya alatt összegyűlt leukocyták 6 órával a WGA beadása után.

(C) Fehérvérsejt aggregátum tapad a hashártya mesothel sejtjeire (nyíl), 4 órával 50 mg/ttkg PHA *i.p.* beadása után. A feltapadás alatti rész megduzzadt az összegyűlt leukocyták tömegétől.

(D) Összegyűlt mononukleáris sejtek a csepleszben (omentum) 40 perccel 5 μ g CINC-1 beadása után. Lektin-kezelés nem volt.

(E) Egy venula intimájához tapadt neutrophil granulocyták, 4 órával a PHA *i.p.* beadása után. A két szélső véna csak kissé reagált.

(F) Főként mononukleáris sejteket tartalmazó thrombus egy kitágult venulában, 6 órával a WGA *i.p.* beadása után.

magyarázzuk, hogy az arteriolák vastag símaizom fala jelentős mértékben visszatartotta, mintegy összegyűjtötte a mobilis sejteket, az akadályt leküzdő sejtek viszont gyorsan továbbhaladtak. Az artériákénál sokkal vékonyabb falú vénák esetében ez a jelenség nem volt kifejezett.

A neutrophil granulocyták erekből való kilépésének WGA-általi stimulálása nemcsak erős, hanem kifejezetten **szelektív** is volt, kialakulásához több óra kellett. A többi vizsgált lektin közül a kerti bab PHA-nak volt aránylag erős hatása, de kevésbé szelektíven.

A szövettani lelet másik jellegzetessége a változatosság volt, más szóval **szorosan egymás mellett lehetett látni erősen reagáló és nem reagáló ereket**. Egyes esetekben ki lehetett mutatni, hogy az erősen reagáló részek a hashártyára tapadt leukocytá aggregátumok alatt helyezkedtek el (PHA kísérlet, 1C kép). Feltehetően az innen felszabaduló mediátorok okozták a granulocyták erős és lokális diapedezisét. Ez a következtetésünk nem mond ellent a leukocytá átviteli kísérletek eredményeivel (1.5. fejezet), tekintve a kétféle kísérlet tartamának jelentős eltérését és a lektinek különbözőségét is.

A szövettani vizsgálatok azonban nemcsak arra utalnak, hogy a lektin-indukált események késői fázisában pro-inflammatorikus mediátorok szabadulnak fel, hanem arra is, hogy a lektinnek legalábbis egy része fokozatosan **felszívódik** a hasüregből. Egyes erekben a vörösvértesteket az endothelre tapadva látjuk (ami fixálási műtermék is lehet), viszont vérlemezkék nélküli, tömör **vörösvértest aggregátumokat** is meg lehetett figyelni (1A kép, nyíllal jelölve), amit a felszívódó lektin közvetlen hatásával magyarázunk. A lektin egyébként más módon is távozhat a hasüregből, mégpedig a rekesznél levő és nyirokerekben folytatódó „túlfolyó nyílásokon” keresztül, ezt a folyamatot azonban nem vizsgáltuk.

Ismeretes, hogy a vérlemezkéket aktiválják a rajtuk megtapadó lektinek. Ez lehet az oka, néhány kis véna **thrombotizálódásának**, kitágulástól kísérve (1F kép). Az alvadékban nagyon különböző sejteket lehetett látni: vörösvértesteket, vérlemezkéket és makrofág jellegű mononukleáris sejteket, amelyek hajlamosak voltak többmagvú óriássejteké átalakulni. A granulocytáknak az erekből való kilépésével összhangban ezek hiányoztak a thrombusból, miközben erősen feldúsultak a limfociták.

2.3. Az i.p. beadott CINC-1 hatása a leukocytákra

Ismeretes, hogy a humán mesothel sejtek bizonyos stimuláló hatások után több órával interleukin-8-at képesek termelni és leadni, amely aztán kiváltja a leukocyták diapedezisét. Az Il-8 homológja rácsálókban a cytokine-induced neutrophil attractant (CINC). A Sigmától vásárolt CINC-1 citokin segítségével megpróbáltuk ezért reprodukálni a WGA-kiváltotta leukocytá diapedezist. Öt µg CINC-1-et adtunk be egérnek i.p., de a kísérlet tartamát 6 óra helyett 40 percre redukáltuk, ui. itt nem akartuk a citokint megtermeltetni, hanem azt készen adtuk be. A szövettani lelet azonban jelentősen különbözött a WGA-kezelt állatokétól: míg az utóbbiakban szelektív granulocytá kilépést lehetett megfigyelni, addig a CINC-1 hatására limfocita jellegű mononukleáris sejtek jelentek meg (1D kép).

Végeredményben tehát nem sikerült tisztított citokinnel reprodukálnunk a WGA-indukált elváltozásokat.

2.4. A ConA-kezelt hashártya TEM vizsgálata

A kísérletek és vizsgálatok a Semmelweis Egyetem Humánmorfológia és Fejlődésbiológia Tanszékén történtek L. Kiss Anna laboratóriumában. A vizsgálatok során számos váratlan probléma merült fel, mint például a hashártya kettőzetekből történő mintavétel: a zsírszövet nélküli, átlátszó részek belevágáskor összeugrottak (előzetes fixálás esetén is) és szinte láthatatlanná váltak. A másik probléma az volt, hogy a hashártya lektin-stimulált szekréciójával járó strukturális változásokat nem tudtuk tracer-rel követni, mert az i.v. bevitt ferritinnek, illetve kationos ferritinnek az erek endothelje gátat szabott és csak

nagyon kevés nyomjelző ért el a hashártyáig. A hashártya alá fecskendezés esetén viszont megszűntek volna a fiziológiás körülmények. Ezt a problémát mindeddig még nem sikerült megoldanunk.

Régóta ismeretes, hogy az erek endotheljében bizonyos hatásokra (pl. oxigén hiány) vacuolák jelennek meg. Dvorak munkacsoportjában (Harvard) szisztematikusan vizsgálták ezeket és megállapították, hogy egy olyan sejt organellumról van szó (Dvorak AM és Feng D: *The vesiculo-vacuolar organelle ((VVO)): A new endothelial cell permeability organelle*, J. Histochem. Cytochem. 49, 419, 2001), amely közvetlenül a VEGF nevű citokin hatására alakul ki. Munkánkban ezt az átmenetileg kialakuló, majd eltűnő organellumot (VVO) megtaláltuk a hashártya mesothel sejtjeiben is. Ebből először arra következtettünk, hogy a ConA ascites-indukáló hatását a VEGF mediálja. Kísérleti körülményeink standardizálása után azonban a VVO már nem jelent meg és a VEGF-R2 receptor gátló antagonistával végzett kísérleteink (1.10. fejezet) sem támasztották alá a fenti feltételezést.

A ConA-val nem kezelt, kontroll egerekben és patkányokban a mesothel sejtek abluminális részén a membrán nagy számban mutatott jellegzetes behúzódasokat, caveolákat. A lektin-kezelt sejtek citoplazmájában viszont a caveolák lefűződése miatt megnőtt a vesiculák száma. Bár kísérleteink még nem fejeződtek be, **úgy látszik, hogy a vesiculák jelentik a ConA-stimulált peritoneális szekréció morfológiai korrelátumait.**

2.5. Jelátvitel

Amikor a ConA rátapad a mesothel sejtek luminális oldalára, a szekréció a vesiculák kialakulásával a sejt túloldalán indul meg, ami egy jelátviteli folyamatra utal. Az Evans-blue-jelzett albuminnak a vérből a hasüregbe való átjutása (1.4. fejezet) pedig azt bizonyítja, hogy a feltételezett jel a szubperitoneális erekhez is eljut és ott is permeabilitást növel. Ennek morfológiai jeleit az ereken azonban eddig még nem sikerült megtalálnunk. A szignalizáció vizsgálata további terveink közé tartozik.

3. Lipopoliszaccharid (LPS) kísérletek

3.1. LPS izolálása különböző Gram-negatív baktériumokból

A kísérletekhez a baktériumok elszaporítása és az LPS izolálás Kocsis Béla laboratóriumában történt (Orvosi Mikrobiológia, Ált. Orvosi Kar, PTE, Pécs). Az izolálás Westphal és Jann (1965) fenolvizes módszerével történt, kivéve a leginkább hidrofób variánsokat, ahol Galanos és mtsai (1969) ún. PCP módszerét használtuk. Az *E. coli* O83 LPS-t többféle állatkísérlethez is használtuk, ezért ebből nagyon nagy, több grammos mennyiséget állítottunk elő, míg a többi (17-féle) molekula-variánst *in vitro* használtuk fel. Tisztítás és liofilezés után az LPS-t 4°C-on tároltuk. A különleges LPS variánsokat tartalmazó két baktérium fajtából (*P. gingivalis* és *R. spheroides*) az izolálás még nem fejeződött be.

3.2. Az LPS hatás a bél morfometriai tulajdonságaira (Illyés, Kocsis és Baintner)

Ismeretes, hogy az endotoxin (LPS) a bélsatornából csak nyomokban vagy egyáltalán nem szívódik fel. Nem vizsgálták azonban, hogy nem fejthet-e ki hatást valamilyen receptoron keresztül a bél szerkezetére, pl. a sejtszótódás stimulálásával. Fejlődő patkányokba gyomor-szondán át *E. coli* O83 endotoxint adtunk be (400 mg/ttkg minden alkalommal) három napon át minden 8. órában, majd az állatokat levágtuk. A vékonybél három helyéről vett szövettani minták morfometriai vizsgálata (Scion Image software) nem mutatott különbséget a kontroll állatokhoz képest.

Hasonlóképpen nem mutattak különbségeket az aktív fázis sejtek (monoclonal anti-rat Ki67 antibody), az apoptotikus sejtek (TUNEL) és az organizer region-associated protein (AgNOR) kimutatását szolgáló a hisztokémiai vizsgálatok eredményei.

Bár a használt LPS adagok parenterális beadáskor óriásiaknak számítanak, orális beadás után nem lehetett toxikus tüneteket megfigyelni, ami összhangban van az irodalommal.

3.3. A ConA-LPS reakció vizsgálata (Kocsis B. és Baintner)

Előzmény: Ismeretes, hogy számos Gram-negatív baktérium reagál a ConA-val, de más típusú lektinekkel nem szokott reakció mutatkozni. Korábban ezt különböző bendő baktérium fajokkal mi is kimutattuk. Elsősorban a baktérium felületén levő LPS reagál.

A jelen vizsgálatokban módszertani fejlesztést végeztünk, továbbá a különböző eredetű LPS készítményekkel szerkezet/reaktivitás összehasonlítást is.

Mivel számos LPS aggregálódásra (micellák képzésére) hajlamos, ez gátolhatja az agarózban való diffúziójukat és ezért a lektin-reakció kimutatását is az Ouchterlony-technikának megfelelően. Ezeknél az LPS-eknél a vizsgálatot 50°C-nál is elvégeztem (az acil-csoportok olvadáspontja felett), ez azonban csak egyetlen LPS-nél volt eredményes. Más LPS-eknél egy Mancini-szerű technika volt eredményes. Itt az LPS-t az agarózba foglaltuk, a ConA pedig az agarózba vágott medencékből diffundált kifelé. Reakció esetén a medence körül világosabb udvar alakult ki. A módszer annyiban különbözik a Mancini-technikától, hogy ott az agarózba foglalt komponens is mobilis, míg nálunk az LPS egy stacioner fázist alkotott. Másrészt nálunk nem alakult ki egyértelmű végpont a reakcióban. Mindenesetre ez a technika nemcsak hogy kvantitatívra tehető, hanem egyértelmű elbírálást tesz lehetővé, szemben a hemagglutinációs lemezen végzett próbával, ahol az elbírálás nem egyértelmű.

Az *E. coli* O83 LPS-ből ecetsavas hidrolízissel izolált oligoszaccharid (O-antigén) agarózban a ConA-val halvány precipitációs ívet produkált (Ouchterlony-technikával). A reakció oka az ismétlődő egységekben levő cukor egységek előfordulása. Amikor a molekulában a lipid A is jelen volt, masszívabb precipitáció jelentkezett, jöllehet maga a lipid A nem reagál a ConA-val, de elősegíti a precipitációt.

A *Shigella sonnei* LPS „outer core” glükózt is tartalmaz, de a teljes mutációs sorozat egyik tagjánál sem lehetett reakciót kimutatni a ConA-val. Ennek legvalószínűbb oka, hogy molekulánként egyetlen glükóz esetén a molekula monovalens és így nem képes keresztkötéseket kialakítani a precipitációhoz. A különböző eredetű LPS-ekben előforduló különleges cukrok (KDO, manno-heptóz, kolitóz, altruronsav) valószínűleg nem reagálnak ConA-val, legalábbis a mutáns sorozatokban nem láttuk ennek jelét. Az N-acetil-glükózamin pedig azért nem képes reagálni, mert hidroxiljait acil-csoportok kötik le. A kísérletekről beadandó cikk kéziratát elkészítettük és nyelvi lektorálás után az *Acta Veterinaria Hungarica* c. folyóiratban szeretnénk publikálni.

4. Lektinek tisztítása

Korábbi kísérleteinkben (Baintner és mtsai, 2003) kimutattuk, hogy az akácakéregből izolált lektin (RPA-I) erősen gátolja a gyomor ürülését és étvágytalanságot okoz. Ezt az alapjelenséget, ami specifikusnak látszik az RPA-ra, kívántuk tovább vizsgálni patkányon, mert az egér erre kevésbé alkalmas. A patkány-kísérletekhez viszont annyi lektinre van szükség, amennyit megvásárolni nem tudtunk volna. A lektin izolálásához megkezdtuk az akácágak gyűjtését, a kéreg lefejtését és extrahálását. A munkát polgári szolgálatos volt hallgatóinkra alapoztuk, személyi kifizetést erre nem terveztünk. A sorkatonaság megszüntetése után azonban munkaerő ellátásunk is megszűnt és a témának ezt a részét nem folytattuk tovább.

A fenti okból elmaradt a búzacsíra lektin (WGA) tisztítása is. Korlátozott volumenű kísérleteinket a már korábban rendelkezésünkre álló WGA-készítménnyel végeztük. Ezt Kiss Pétertől kaptuk (ahogy a PHA készítményt is), aki az izolálást korábban, a néhai GATE (Gödöllő) Mezőgazdasági Kémia Tanszékén végezte.

Rövid összefoglalás (másolat)

Elsősorban a növényi lektinek biol. hatásait vizsgáltuk, mégpedig a hemaggl. elkerülésére i.p. fecskendezve rágcsálókba. A mesothel sejtfelszíni glikoprotein oldalláncain megtapadó, különböző spec. lektinek (és polikationok is) fehérje-dús ascites-folyadék szekrécióját váltották ki, nem-kovalens keresztkötések képzése miatt. Egyes lektinek i.p. beadása után néhány óra késéssel a pleura és pericardium is szekretálni kezdett, a szövet-spec. hatás okát tisztáztuk. Ezután ConA-t használtunk modell-lektinként. Ellentétben az orális hatással, a peritoneális hatás nem idegi mediációjú. Eleinte a pro-inflammatorikus mediátorok sem vesznek részt benne, csak néhány óra elteltével. A kallikrein-gátló aprotinin részben gátolt, de az eNOS gátlása nem hatott. Az ér permeabilitást növelő hisztamin és lipopoliszaccharid (LPS) dózis-függő ascites-gátlást mutatott, amit csak direkt a mesothel sejtekre irányuló hatással lehet magyarázni. Tehát fordított hatásuk van a mesothelre, mint az endothelre. Ez a munka legfőbb eredménye. – Szubakut kísérletekben a hashártyára tapadt leukocytá aggregátumok lokálisan leukocyták kilépését váltották ki az erekből, ami a WGA esetén szelektív neutrophil diapedezis volt. Sok jelét találtuk a lektinek fokozatos felszívódásának a hasüregből. – Módszert dolgoztunk ki a ConA-LPS reakció agaróz-gélben való vizsgálatára és összehasonlítottuk a különböző szerkezetű LPS-ek reakcióit. – Orális LPS utáni bél morfometria negatív volt. (1484 leütés)

Megjegyzések

Nem használtuk ki az április 30-ig engedélyezett szakmai zárójelentés határidő hosszabbítást. Legfontosabb eredményeinket szeretnénk alaposan „körbejárni”, ezért inkább a kevésbé fontos részek vannak közlés alatt. Kérem ezért **az Összefoglalás késleltetett közreadását**. A két 2004-es cikkünknek csak a kisebbik része készült a jelen támogatás keretében, a cikkek végén mindkét forrást jeleztük.

Munkánkban a stimulált peritoneális szekréció vizsgálata nemcsak hogy számos új eredményt hozott, de új kérdéseket is felvetett, amiért is a munkát szeretnénk folytatni.

Javaslat bírálókra

Koller Ákos (keringés) Semmelweis Egyetem, Kórélettani Intézet, Bp. Nagyvárad-tér 4;
Gelencsér Éva (lektinek) Közp. Élelmiszertud. Kut. Int., Bp. Hermann Ottó-u. 15;
Mézes Miklós (antinutritív fehérjék) SztIstván Egy., Takarmányozástani Tanszék, Gödöllő;
Kerényi Tibor (hisztopathológia) Semmelweis Egy., II. Patológiai Intézet, Bp. Üllői-út 93;
Nagy Béla (LPS) Állatorvostudományi Kutató Intézet, Bp. Hungária-krt. 21.